



TITLE:

Sequence-Specific Alkylation By Pyrrole-
Imidazole Polyamide Seco-CBI Conjugates
To Target Cancer-Associated Mutations.(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Rhys, Dylan Taylor

CITATION:

Rhys, Dylan Taylor. Sequence-Specific Alkylation By Pyrrole-Imidazole Polyamide Seco-CBI Conjugates To Target Cancer-Associated Mutations.. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18824>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は
2016/02/28に公開

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	Rhys Dylan Taylor
論文題目	Sequence-Specific Alkylation By Pyrrole-Imidazole Polyamide <i>Seco</i> -CBI Conjugates To Target Cancer-Associated Mutations (変異がん遺伝子を標的としたピロール・イミダゾールポリアミド <i>seco</i> -CBIコンジュゲートによるDNA配列特異的アルキル化)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA alkylating agents are routinely used in the treatment of cancers. The severe cytotoxicity associated with alkylating agents is due to their lack selectivity, alkylating DNA throughout the genome and attacking healthy cells, notably the reproductive, bone marrow and other labile cells as well as the cancerous cells. If we could directly target DNA mutations responsible for cancer we could reduce some of the side affects and increase the efficacy of the treatments. In this thesis an approach to directly and selectively target DNA sequences is presented using alkylating hairpin <i>N</i>-methylpyrrole-<i>N</i>-methylimidazole (Py-Im) polyamide <i>seco</i>-CBI conjugates.</p> <p>KRAS is one of the most commonly activated oncogenes with around 90% of pancreatic cancers and 50% of colorectal cancers contain KRAS mutations. To date there have been no clinical inhibitors of KRAS, and it has led many to think of KRAS as an “undruggable” target. Point mutations most frequently occur at codons 12, 13 and 61. Mutations at codons 12 and 13 cause steric hindrance through a conformational change of the protein that inhibits GAP-induced GTP (active) hydrolysis to GDP (inactive), and causes the KRAS protein to be permanently activated. Due to the high significance of the mutations at codons 12 and 13, a small library of alkylating hairpin Py-Im polyamide <i>seco</i>-CBI conjugates were designed to selectively target each of these mutation sequences.</p> <p>1. Selective Targeting Of KRAS Codon 12 Mutation Sequence By Pyrrole-Imidazole Polyamide <i>Seco</i>-CBI Conjugates.</p> <p>For efficient binding of Py-Im polyamides to sequences over 7 base pairs, a β alanine should be incorporated in place of a Py. Four hairpin Py-Im polyamides were designed with the same sequence recognition moiety, but the positioning of the β-alanine pairing was varied. High-resolution denaturing gel electrophoresis demonstrated sequence specific alkylation of the KRAS codon 12 mutation sequence for both the G12D and G12V mutation sequences. Conjugate 4 displayed the highest selectivity with high reactivity. Next Generation Sequencing and Bind-n-Seq analysis supported the evidence that Py-Im polyami</p>			

de **4** can target the G12D mutation sequence with exceptionally high affinity and also the G12V mutation sequence with much higher affinity than the wild type sequence.

2. Sequence-Specific DNA Alkylation Targeting for KRAS Codon 13 Mutation by Pyrrole-Imidazole Polyamide *Seco*-CBI Conjugates.

Five alkylating hairpin Py-Im polyamides were designed to target the KRAS codon 13 mutation, as with the previous library targeting the codon 12 mutation sequence, all five conjugates possessed the same basic core moiety but the position of the β -alanine pairing was varied by substituting a Py. DNA alkylation was evaluated using high-resolution denaturing gel electrophoresis and revealed that conjugate **5** alkylated with the highest efficacy. Additionally conjugate **6** displayed high selectivity for the target sequence but only limited reactivity. SPR and a computer-minimized model suggested that **5** binds to the target sequence with high affinity in a hairpin conformation, allowing for efficient DNA alkylation.

3. Sequence-Specific DNA Alkylation By Tandem Pyrrole-Imidazole Polyamide Conjugates

Alkylating tandem hairpin Py-Im polyamides can be used to targeting repeating sequences such as human telomere sequences, and could be useful for targeting cancer cells. In order to investigate the alkylating activity of tandem hairpin Py-Im polyamides three linkers of various lengths were evaluated using High-resolution denaturing gel electrophoresis. A β alanine linker, a β alanine dimer linker and a PEG linker were evaluated. The β -alanine linker provided the optimal linker length to alkylate a 10 base pair DNA sequence with high reactivity and minimal mismatch binding. Furthermore, the tandem Py-Im polyamides were able to bind with higher specificity than corresponding alkylating hairpin Py-Im polyamides designed to bind to the same sequence.

In conclusion, alkylating hairpin Py-Im polyamide *seco*-CBI conjugates have demonstrated sequence specific alkylation of the coding region of the KRAS codon 12 and codon 13 mutation sequences. Specifically, the codon 12 G12D and G12v mutations were selectively targeted with far higher affinity than that of the wild type sequence. Furthermore, alkylating tandem hairpin Py-Im polyamide *seco*-CBI conjugates demonstrated higher selectivity for a 10 base pair sequence than corresponding hairpin Py-Im polyamides with the β alanine linker providing the optimal distance to span 1 base pair between the two hairpins to allow for efficient sequence specific alkylation. The results strongly suggest that *seco*-CBI Py-Im polyamides have the potential to be used to treat cancers based on individual genetic mutations, minimizing side effects and overcoming the problem of drug-resistance.

(論文審査の結果の要旨)

DNAアルキル化剤はがん治療において長年広く使われているが、標的としているがん細胞以外の正常細胞にも作用するため、厳しい副作用が問題となっている。がん化の原因となるDNA変異を直接狙うことができれば、上述のような副作用を軽減し薬剤の効用を上昇させることが期待される。当論文においてDNA結合リガンドであるヘアピン型N-メチルピロール・N-メチルイミダゾールポリアミド（以下、ヘアピン型PIP）を用いて、直接かつ選択的に特定DNA配列を標的とするアプローチに関して記述している。

KRAS遺伝子は約90%の膵臓がん、50%の大腸がんでその変異型が活性化されていることが知られるがん遺伝子であり、現在までにKRASの発現を抑制する臨床レベルでの阻害剤は実用化されておらず薬剤開発が難しい標的として考えられてきた。がん化に関連するKRAS遺伝子の点突然変異にはコドン12、13、61が報告されている。コドン12、13変異KRASタンパク質はその構造変化によって立体障害を引き起こし、GTP（活性型）からGDP（不活性型）への加水分解が阻害され、KRAS遺伝子が永久的に活性化されてしまう。このようにコドン12、13点変異ががん化促進の原因となることから、本研究においてそれらの点変異を標的としたヘアピン型PIP-*seco*-CBIコンジュゲートライブラリーを設計した。

1. ピロール・イミダゾールポリアミド *seco*-CBIコンジュゲートによるコドン12変異型KRAS遺伝子配列の選択的ターゲティング

7塩基対以上の配列認識に対する効果的な結合にはPIPの構成要素であるN-メチルピロールの代わりにβ-アラニンを組み込むことが有用であることが考えられ、今回同じ認識配列に対してβ-アラニンの位置を変化させた4種のヘアピン型PIP-*seco*-CBIコンジュゲートを設計した。高解像度ゲル電気泳動によるDNAアルキル化活性の分析の結果、KRASコドン12点変異配列に対する配列特異的アルキル化が観測され、コンジュゲート4において最も高い配列選択性と反応性を示した。次世代シーケンサーを用いた結合モチーフ解析においてもコンジュゲート4によるKRASコドン12点変異配列認識を示唆する結果が得られた。

2. コドン13変異型KRAS遺伝子を標的としたピロール・イミダゾールポリアミド *seco*-CBIコンジュゲートによるDNA配列特異的アルキル化

KRASコドン13点変異配列に対して、β-アラニンの位置を変化させた5種のヘアピン型PIP-*seco*-CBIコンジュゲートを設計した。高解像度ゲル電気泳動によるDNAアルキル化活性の分析の結果、コンジュゲート4において高い配列選択性と反応性を示し、コンジュゲート5において反応性は低いものの、比較的高い配列選択性を示した。ビアコアによる結合能分析と分子モデリングによりコンジュゲート4の母体となるPIPが標的配列に対して高い結合能力を持ち、効果的なアルキル化を示唆する結果が得られた。

3. タンデム型ピロール・イミダゾールポリアミドコンジュゲートによるDNA配列特異的アルキル化

リンカーを介してヘアピン型PIPを直列に連結させたタンデムヘアピン型PIPは、テロメア配列などのリピート配列を標的とする場合に効果的であり、がん細胞を標的とする場合に有用であると考えられる。リンカーの長さによるアルキル化活性への影響を調べるために、 β -アラニン、 β -アラニンダイマー、PEGリンカーの3種に対して高解像度ゲル電気泳動により評価を行った。その結果、 β -アラニンリンカーを持ったアルキル化タンデムヘアピン型PIPが10塩基対認識において高い反応性と配列特異性を示した。さらに、アルキル化タンデムヘアピン型PIPは、同配列を認識するように設計したアルキル化ヘアピン型PIPに比べて高い配列選択性があることが示された。

ヘアピン型PIP-*seco*-CBIコンジュゲートによるKRASコドン12、13点変異配列選択的アルキル化が高解像度ゲル電気泳動により示された。特にコドン12点変異配列へのアルキル化は、野生型配列に対して非常に高い選択性を示した。また β -アラニンを介したアルキル化タンデムヘアピン型PIPは10塩基対認識において、相当するアルキル化ヘアピン型PIPよりも高い配列選択性を示した。これらの結果は、PIP-*seco*-CBIコンジュゲートが副作用や薬剤耐性の克服、個々の遺伝子変異に基づいたがん治療に対して有用であることを示唆している。

以上、本論文では、コドン12および13変異型KRAS遺伝子配列の選択的ターゲティングするピロール・イミダゾールポリアミド*seco*-CBIコンジュゲートを合成し、DNAアルキル化が選択的に標的とする配列で起こることを実証した。さらに、10塩基対を認識するタンデムヘアピン型PIPの合成にも成功した。これらの申請者の成果は、高い有機合成化学技術と生化学的な解析手法を用いることで成し遂げられたものであり、従来の方法では技術的に成しえなかったものである。これらの成果は核酸のケミカルバイオロジーの世界で画期的であり、大きなインパクトを持つ。これらの配列特異的なアルキル化剤は副作用の少ない抗がん剤など多方面に使用可能であり、将来の応用性も高い研究である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月15日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降